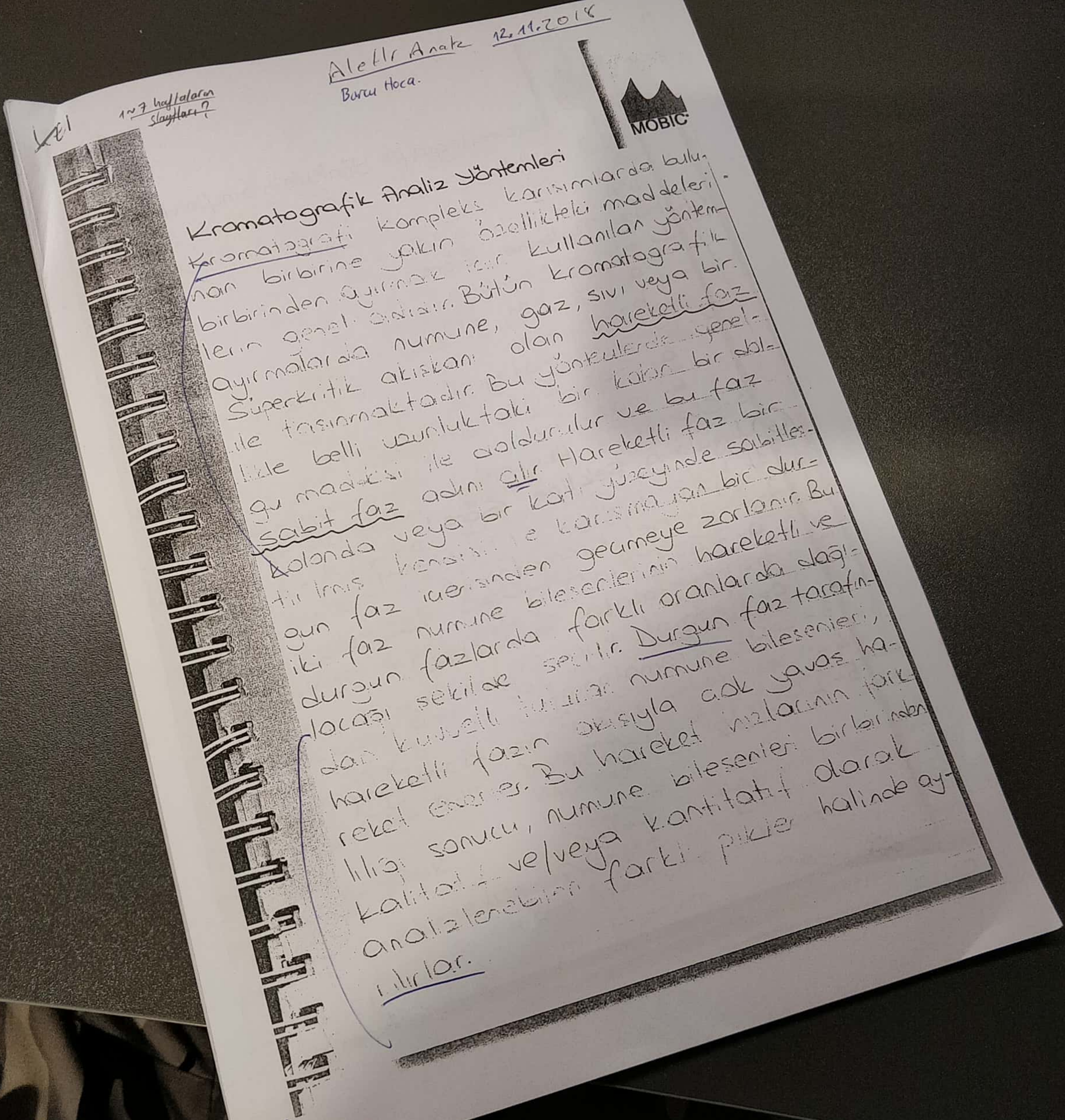


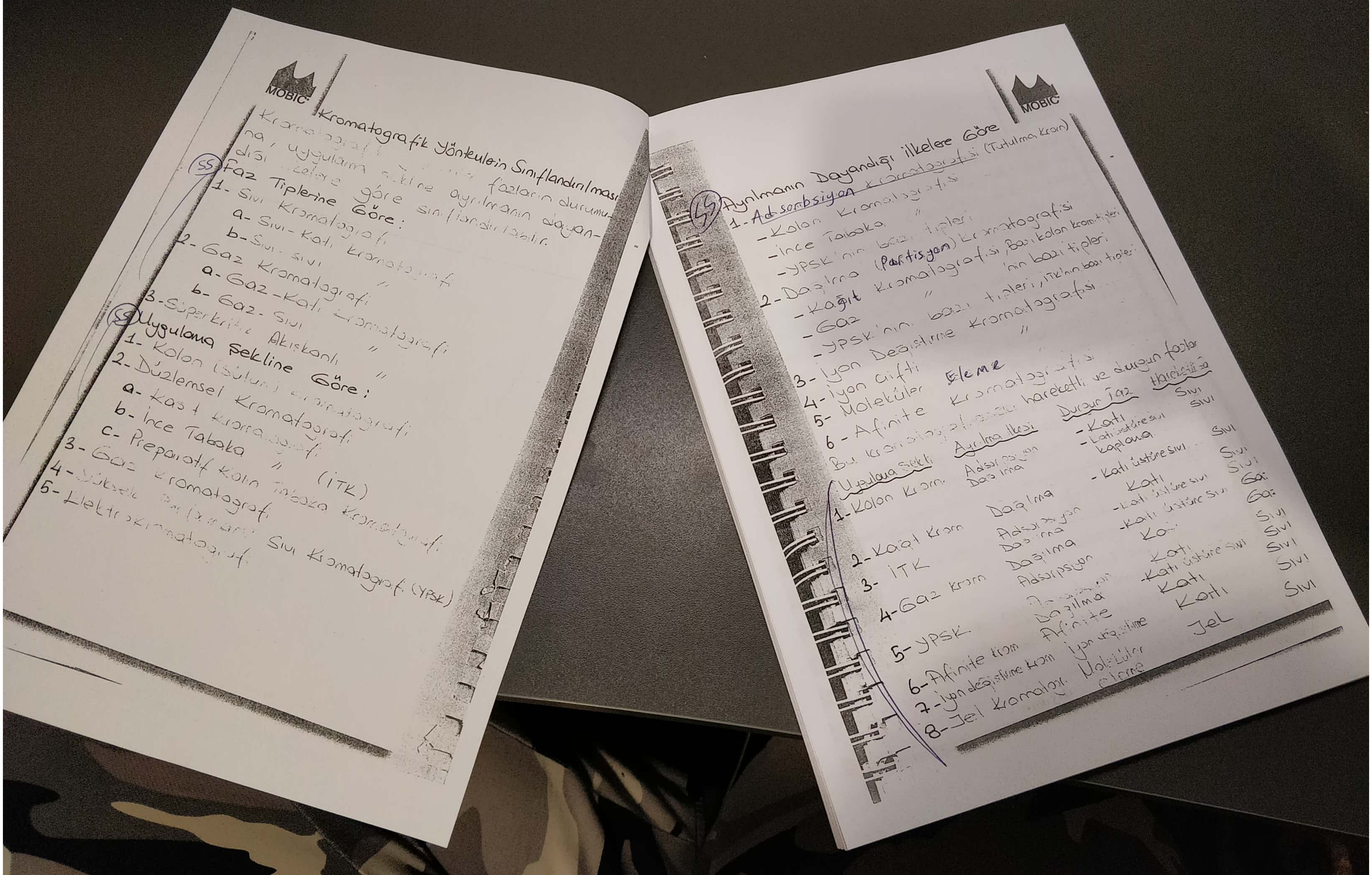
Ł1 1~7 haftaların slaytları?

Aletli Analiz 12.11.2018

Burcu Hoca.

Kromatografik Analiz Yöntemleri

Kromatografi kompleks karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri birbirinden ayırmak için kullanılan yöntemlerin genel adıdır. Bütün kromatografik ayırmalarda numune, gaz, sıvı veya bir Süperkritik akışkan olan hareketli faz ile taşınmaktadır. Bu yöntemlerde genellikle belli uzunluktaki bir kolon bir dolgu maddesi ile doldurulur ve bu faz sabit faz adını alır. Hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyinde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içerisinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz numune bileşenlerinin hareketli ve durgun fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirinden kalitatif ve/veya kantitatif olarak analizlenebilen farklı pikler halinde ayrılırlar.



Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografi [illegible] fazların durumuna, uygulama şekline [illegible] ayrılmanın dayandığı ilkelere göre sınıflandırılabilir.

(SS) Faz Tiplerine Göre:

1- Sıvı Kromatografi
  a- Sıvı-Katı kromatografi
  b- Sıvı-sıvı "
2- Gaz Kromatografi
  a- Gaz-Katı kromatografi
  b- Gaz-Sıvı "
3- Süperkritik Akışkanlı "

(SS) Uygulama Şekline Göre:

1- Kolon (sütun) kromatografi
2- Düzlemsel Kromatografi
  a- Kağıt kromatografi
  b- İnce Tabaka " (İTK)
  c- Preparatif Kolon Tabaka Kromatografi
3- Gaz Kromatografi
4- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (YPSK)
5- Elektrokromatografi

(SS) Ayrılmanın Dayandığı İlkelere Göre

1- Adsorbsiyon kromatografisi (Tutulma Krom)
  - Kolon Kromatografisi
  - İnce Tabaka "
  - YPSK'nın bazı tipleri
2- Dağılma (Partisyon) Kromatografisi, Bazı kolon krom. tipleri
  - Kağıt Kromatografisi
  - Gaz " 'nin bazı tipleri
  - YPSK'nın bazı tipleri, İTK'nın bazı tipleri
3- İyon Değiştirme Kromatografisi
4- İyon çifti "
5- Moleküler Eleme Kromatografisi
6- Afinite "

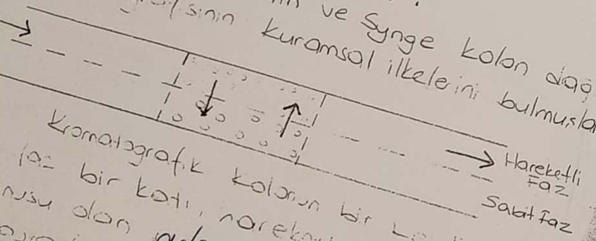
Bu kromatografilerde [illegible] hareketli ve durgun fazlar

Uygulama şekli	Ayrılma İlkesi	Durgun faz	Hareketli faz
1- Kolon Krom.	Adsorpsiyon Dağılma	- Katı - Katı üstüne sıvı kaplama	Sıvı Sıvı
2- Kağıt Krom	Dağılma	- Katı üstüne sıvı	Sıvı
3- İTK	Adsorpsiyon Dağılma	Katı - Katı üstüne sıvı	Sıvı Sıvı
4- Gaz Krom	Dağılma Adsorpsiyon	- Katı üstüne sıvı Katı	Gaz Gaz
5- YPSK	Adsorpsiyon Dağılma	Katı - Katı üstüne sıvı	Sıvı Sıvı
6- Afinite krom	Afinite	Katı	Sıvı
7- İyon değiştirme krom	İyon değiştirme	Katı	Sıvı
8- Jel Kromatografi	Moleküler eleme	Jel	Sıvı

Kromatografinin en temel sınıflandırılmasında ise durgun ve hareketli fazlara ve fazlar arasındaki dengelerin cinslerine göre 3'e ayırdığını belirtmiştik. Sıvı, gaz ve süperkritik akışkanlı kromatografi. Bunlarda hareketli faz [illegible] anlaşılacağı [illegible] sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Bunlardan sadece sıvı kromatografi hem kolonlarda hem de düz yüzeylerde gerçekleştirilebilir; gaz ve süperkritik akışkanlı kromatografi sadece kolonda gerçekleştirilir ve kolonun iç yüzeyinde hareketli faz bulunur.

Kromatografinin Teorisi :

1941 yılında Martin ve Synge kolon dağılma kromatografisinin kuramsal ilkelerini bulmuşlardır.



Kromatografik kolonun bir kesiti

Sabit faz bir katı, hareketli faz bir sıvı ise söz konusu olan adsorbsiyon temelli sıvı-katı kromatografisidir. Sabit faz gözenekli bir katı üzerine emdirilmiş veya kaplanmış bir sıvı, hareketli faz [illegible] dağılma [illegible] başka bir sıvı ise söz konusu olan dağılma temelli sıvı-sıvı kromatografisidir. Sıvı-sıvı kromatografisinin teorisi diğer kromatografi çeşitlerine de kolaylıkla uygulanabilir.

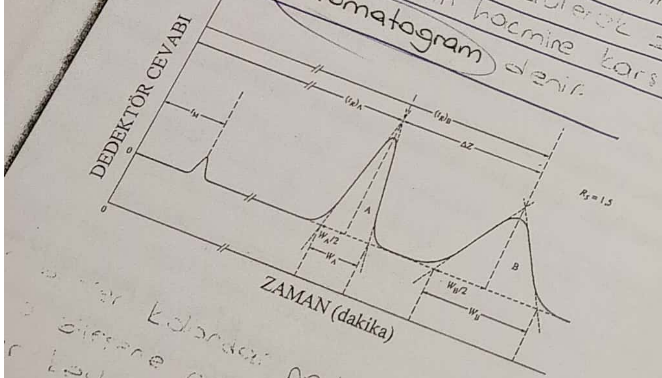
Analizlenecek örnek, kolonun bir ucundan aynı anda kolona verilir ve hareketli faz ile kolonun diğer ucuna doğru sürüklenerek taşınır. Kolondan analiz numunesi geçirildiği zaman, sabit ve hareketli fazlar arasında dağılmaya uğrar. Hareketli faz numune [illegible] taşınmasında sürükleyici, sabit faz ise geciktirici görev yapar. Sabit faz denen dolgu maddesi ile analizlenecek maddenin etkileşmesi nedeni ile bu taşınma sırasında örnek, kolondaki sabit faz tarafından bir miktar tutulur. Bu tutunma örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlardadır. Bir bileşenin sabit ve hareketli faz arasındaki dağılımı bir katsayı [illegible] [illegible]. Buna dağılma katsayısı [illegible] verilir ve ; $\boxed{K = \frac{C_s}{C_h}}$ oranı ile bulunur.

Dağılma katsayısı = $K = \frac{C_s}{C_h}$ → K↑ ise, sbt fazda iyi tutunur.

[illegible] olur, bileşenin sabit

K'nın [illegible]

fazda iyi tutunduğunun ve bu yüzden kolonda yavaş ilerlediğinin göstergesidir. K'nın değerinin küçük oluşu ise bileşenin hareketli faza ilgisinin daha fazla olduğunun ve kolondan daha hızlı çıktığının göstergesidir. Bir karışımdaki bileşenlerin K değerlerinin farklı olması sonucu, kolonda farklı hızda ilerlerler ve birbirlerinden ayrılarak kolondan çıkarlar. Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerinin uygun bir yöntemle ölçülerek zamana veya hareketli fazın hacmine karşı çizilen grafiğine Kromatogram denir.



ler kolondan ne kadar erken çıkar-
bileşene ait kromatografi piki o
r keskin olarak elde edilir. Kolondan
kan maddenin piki ise genişleyerek

çıkar. Bir bileşenin pikinin maksimumuna karşılık gelen süreye alıkonma süresi, t_R, hacime ise alıkonma hacmi, V_R adı verilir. Kromatogramlar yardımı ile hem kalitatif hem de kantitatif analiz yapılır. Alıkonma zamanları yardımı ile kalitatif, pik alanları veya yüksekliklerinin ölçümü ile de kantitatif analiz yapılır.

Sıvı Kromatografik Yöntemler

Sıvı kromatografik yöntemler kullanılan sabit fazın türüne göre gruplanır. Sabit fazın bir katı dolgu maddesi, hareketli fazın sıvı olduğu yöntemler adsorpsiyona dayalı sıvı-katı kromatografisi yöntemleridir. Kolon, İTK ve YPSK'nın bazı yöntemleri ile gaz kromatografisinin bazı tipleri bu gruptadır.

Sabit fazın bir dolgu maddesi üzerine yayılmış bir sıvı film olarak kullanıldığı yöntemler sıvı-sıvı kromatografisi adını alır. Bu yöntemde bileşenler sabit ve hareketli faz arasında dağılmaya uğrarlar. Maddelerin dağılma katsayılarının farklı oluşuna göre birbirlerinden ayrılırlar. Sıvı-sıvı kromatografisinde

Fark?

farklı polariteleri, sabit ve birbirleriyle karışmayan sıvılar sabit ve hareketli faz olarak kullanılırlar. Sıvı-sıvı kromatografisinin de 2 türü mevcuttur. Sabit fazın etilenglikol gibi polar bir sıvı ve hareketli fazın da hekzan gibi nonpolar bir sıvı olarak kullanıldığı yöntemlere Normal Faz Sıvı Kromatografisi adı verilir. Sabit fazın nonpolar sıvı olarak ve hareketli fazın da polar sıvı kullanıldığı yöntemlere de Ters Faz Sıvı Kromatografisi adı verilir.

Sıvı-sıvı kromatografisine örnek olarak; kağıt kromatografisi, Gaz ve YPSK'nın bazı tipleri, kolon kromatografisinin bazı tipleri ve İTK'nın çok ender kullanılan [illegible] tipleri verilebilir.

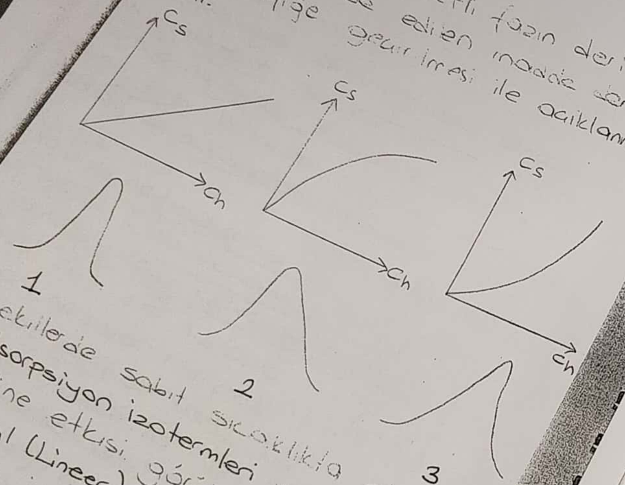
Kolon Kromatografisi:

İlk uygulanan kromatografi çeşididir. Kolon (=sütun) kromatografisinde sabit faz herhangi bir sıvı kaplanmamış katı olup, bu yöntemde olgu maddeleri esenlerin birbirlerinden ayrılması bir boruya doldurulmuş katı yüzeyindeki

farklı adsorbsiyon ilgilerinden yararı olur. Cam boruya çok ince parçacıklar halinde doldurulmuş adsorbana stasyoner (=durgun) faz, ayrılmak üzere kolona konan madde karışımını içeren çözeltiye solut, solut'un sütun içerisinde ilerleyip adsorbe veya desorbe olmasını sağlayan çözücüye de hareketli (mobil) faz denir.

İyi bir adsorban bir çok kimyasal aktif bölge içeren geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır. Sıvı faz içerisinde bulunan maddeler dağılmış tabaka tarafından bu yüzey adsorbe edilirler. Adsorpsiyonda etkili kuvvetler iyonik (elektrostatik), dipol-dipol (kimyasal) ve London (fiziksel tutulma) kuvvetleri veya bunların karışımıdır.

Bir çözelti, bir katının aktif yüzeyinden geçirildiği zaman adsorbsiyona yada desorbsiyona bağlı olarak bir denge meydana gelir. Çözelti halinde kolona verilen maddelerin derişimi ile maddelerin adsorbe edilen miktarları arasınd ilişki, hareketli fazın derişimine karşı, adsorbe edilen madde derişiminin grafiğe geçirilmesi ile açıklanmaktadır.



Bu şekillerde sabit sıcaklıkta elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve bunların pik şekline etkisi görülmektedir.

1. Doğrusal (Lineer): Sıvı kromatografi için istenilen izoterm tipi olup sabit fazdaki adsorbe olan madde ile çözeltideki madde arasında bir doğrusallık vardır. Kromatografide geçen eşitlikler geçerlidir (2 [illegible]).

2- Konveks:
Freundlich izotermi olarak bilinmektedir. Adsorpsiyon eğrisinin doğrusal olmayan kısımlarından madde bozulmuş çan eğrisi şeklinde dağılır.

$K = \frac{C_s}{C_n^{n}}$ n: sisteme ve sıcaklığa göre değişen bir sabit.

3- Konkav:
Adsorpsiyon sırasında bazen ek reaksiyonların oluşması sonucu adsorbsiyon izotermi konkav olur, pik şekli bozulur. Konveks ve konkav tipler analizde hataya yol açarlar.

Kolon kromatografisinde adsorban olarak en fazla kullanılan maddeler, sakkaroz, talk (nonpolar), CaCO$_3$ (nonpolar), MgO, silikajel (polar), aktif kömür, alüminyum oksittir ((polar)). Kullanılan adsorban tanecikler ne kadar küçük olursa ayrılma da o kadar iyi olur. Ama buna karşılık hareketli faz akış hızı azalıp, ayırma süresi uzar. Hareketli faz olarak su, alkol, nitrobenzen, aseton, kloroform, toluen, benzen gibi çözücüler kullan

Çözücü seçimi de adsorban seçimi kadar önemlidir. Eğer çözücü maddeleri çok hızlı elüe ediyorsa maddeler ayrılmadan çıkar, çok yavaş elüe ediyorsa alıkonma zamanı uzayacaktır. Bu nedenle kullanılan çözücülerde elüsyon kuvveti ve dielektrik sabiti dikkate alınmalıdır. Bazı durumlarda da çözücü karışımları (eter; metanol; benzen; eter; metanol; asetonitril; petroleteri: benzen vb) kullanılır. Bir çözücünün elüsyon kuvveti, katı faz ve analiz edilen maddenin özelliklerine bağlıdır. Nonpolar madde analizinde, nonpolar adsorban kullanılırsa, bunlar birbirlerine sıkıca tutunacakları için alıkonma zamanı uzar. Al_2O_3 gibi polar adsorban kullanılırsa, zaman kısalmaktadır.

Sonuç olarak ayrılmanın bileşiklerin, kullanılan hareketli ve durgun fazın polaritelerine göre olduğu söylenebilir.

Kolon kromatografisinde çapları 10-30 mm ve boyları 150-400mm arasında altı musluklu cam borular kullanılır. Kromatografi kolonu 2 teknikle doldurularak hazırlanır.

1- Kuru Teknik: Kolonun dibine cam pamuğu ve süzgeç kağıdı yerleştirilip üzeri dolgu maddesi ile doldurulur. Kolon boyunun yaklaşık yarıdan fazlası doldurulana kadar bu işleme devam edilir. Daha sonra hareketli faz ile bu durgun faz ıslatılır. Daha sonra bu hareketli faz ile birlikte analiz numunesi kolona verilir.

2- Yaş Teknik: Adsorban çözücü ile bulamaç haline getirilir. Alt kısmına pamuk ve süzgeç kağıdı yerleştirilmiş kolona doldurulur. İyice yerleştirilmiş kolona bir cam baget sokularak hava kabarcıklarının varlığı önlenir. Ayrılacak karışım çözücü içerisindeki çözeltisiyle kolona ilave edilir. Musluğun damlama hızı ayarlanır. Maddelerin adsorbana tutunma miktarları farklı olacağı için elüsyon (kromatogram) sırasında yukarıdan aşağıya farklı yerlerde toplanırlar.

Maddeler farklı renklerde ise kolayca ayrılırlar. Renksiz maddelerle çalışılıyorsa uygun bir reaktifle renklendirilir veya

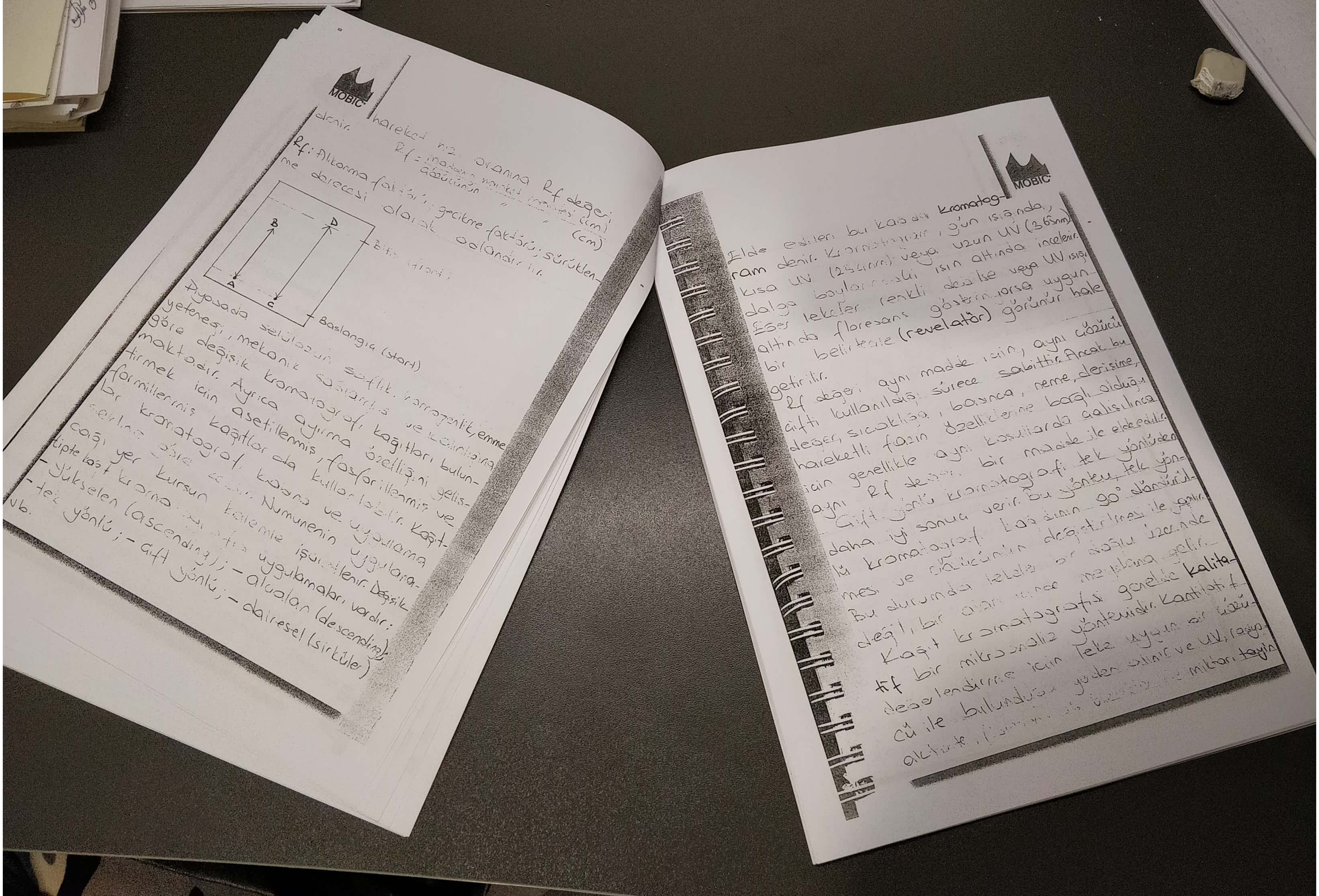
UV ışına tutularak yerleri tesbit edilir. Kolon kromatografisinin ileri tekniklerinde kapalı bir sistem kullanılır ve fraksiyonlar bir dedektör yardımı ile analiz edilirler. UV, refraktif indeks (kırılma indisi), floresans ölçümü ile moleküller sürekli kontrol edilir.

Kolon kromatografisi: basit ve etkili bir ayırma yöntemidir. İzomerler, hormonlar, hidrokarbonlar, antibiyotikler bu yöntemle kolayca ayrılırlar. Dezavantajı iyi bir adsorban ve çözücü bulmak için çok zaman harcanmasıdır. Kullanılan adsorban analiz maddesini parçalamamalı, onunla kimyasal reaksiyon vermemelidir.

bilemiyorum altan 😕

Kağıt Kromatografisi: dağılma kalitatif

Uygulaması en basit kromatografi çeşididir. Kağıt kromatografisinde kağıdın selüloz ağ şebekesine bağlanmış su moleküllerinin oluşturduğu sabit faz ve çözücü veya çözücü karışımından oluşmuş hareketli faz olmak üzere 2 faz vardır. Kromatografi kağıdı uzun lifli, saf selülozdan yapılmış bir tür süzgeç kağıdır. Su ve diğer polar çözücülerle hidrojen bağı oluşturarak bunları belli oranda yüzeyinde adsorbe etme özelliğine sahiptir. Kağıdın önceden ıslatılmasına gerek yoktur. Hareketli faz içerisinde bulunan su bu rolü oynar. Bu yüzden hareketli faz suyla doyurulup kullanılır. Hareketli fazın fenol, eter gibi su ile çok az karışan çözücülerden oluşması gerekir. Bu yöntemde kullanılan hareketli faza **developman fazı** (**developer faz**) da denir. Analizi yapılacak olan sulu madde çözeltisi mikropipet ya da kapiler boru yardımıyla kağıdın belli kısmına emdirilir ve kurutulur. Sonra belli oranda su içeren bir organik çözücü veya çözücü karışımı numunenin uygulandığı kenardan diğer kenara doğru kağıdın emme özelliğinden yararlanılarak geçirilir. Hareketli fazdaki suyun bir kısmı kağıt ile etkileşir ve sabit fazı oluşturur. Numune kağıttaki su bağları ve hareketli faz arasında dağılmaya uğrar. Hareketli faz, numuneden daha hızlı hareket eder. Numunenin (solütün) hareketinin, hareketli fazın



hareket[illegible] oranına Rf değeri denir.

$$Rf = \frac{\text{maddenin hareket mesafesi (cm)}}{\text{çözücünün " " (cm)}}$$

Rf: Alıkoyma faktörü; gecikme faktörü; sürüklenme derecesi olarak adlandırılır.

B
D
A
C
Bitiş (front)
Başlangıç (start)

Piyasada selülozun saflık, homojenlik, emme yeteneği, mekanik sağlamlığı ve kalınlığına göre değişik kromatografi kağıtları bulunmaktadır. Ayrıca ayırma özelliğini geliştirmek için asetillenmiş, fosforillenmiş ve formillenmiş kağıtlar da kullanılabilir. Kağıt bir kromatografi kabına ve uygulama şekline göre [illegible]. Numunenin uygulandığı yer kurşun kalemle işaretlenir. Değişik tipte kağıt kromatografisi uygulamaları vardır:

- Yükselen (ascending); - alçalan (descending);
- tek yönlü; - çift yönlü; - dairesel (sirküler) vb.

Elde edilen bu kağıda kromatogram denir. Kromatogramlar, gün ışığında, kısa UV (254nm) veya uzun UV (365nm) dalga boylarındaki ışın altında incelenir. Eğer lekeler renkli değilse veya UV ışığı altında floresans göstermiyorsa uygun bir belirteçle (revelatör) görünür hale getirilir.

Rf değeri aynı madde için, aynı çözücü çifti kullanıldığı sürece sabittir. Ancak bu değer, sıcaklığa, basınca, neme, derişime, hareketli fazın özelliklerine bağlı olduğu için genellikle aynı koşullarda çalışılınca aynı Rf değeri [illegible] bir madde ile elde edilir.

Çift yönlü kromatografi tek yönlüden daha iyi sonuç verir. Bu yöntem, tek yönlü kromatografi kağıdının 90° döndürülmesi ve çözücünün değiştirilmesi ile yapılır. Bu durumda lekeler bir köşegen üzerinde değil, bir alan üzerinde meydana gelir.

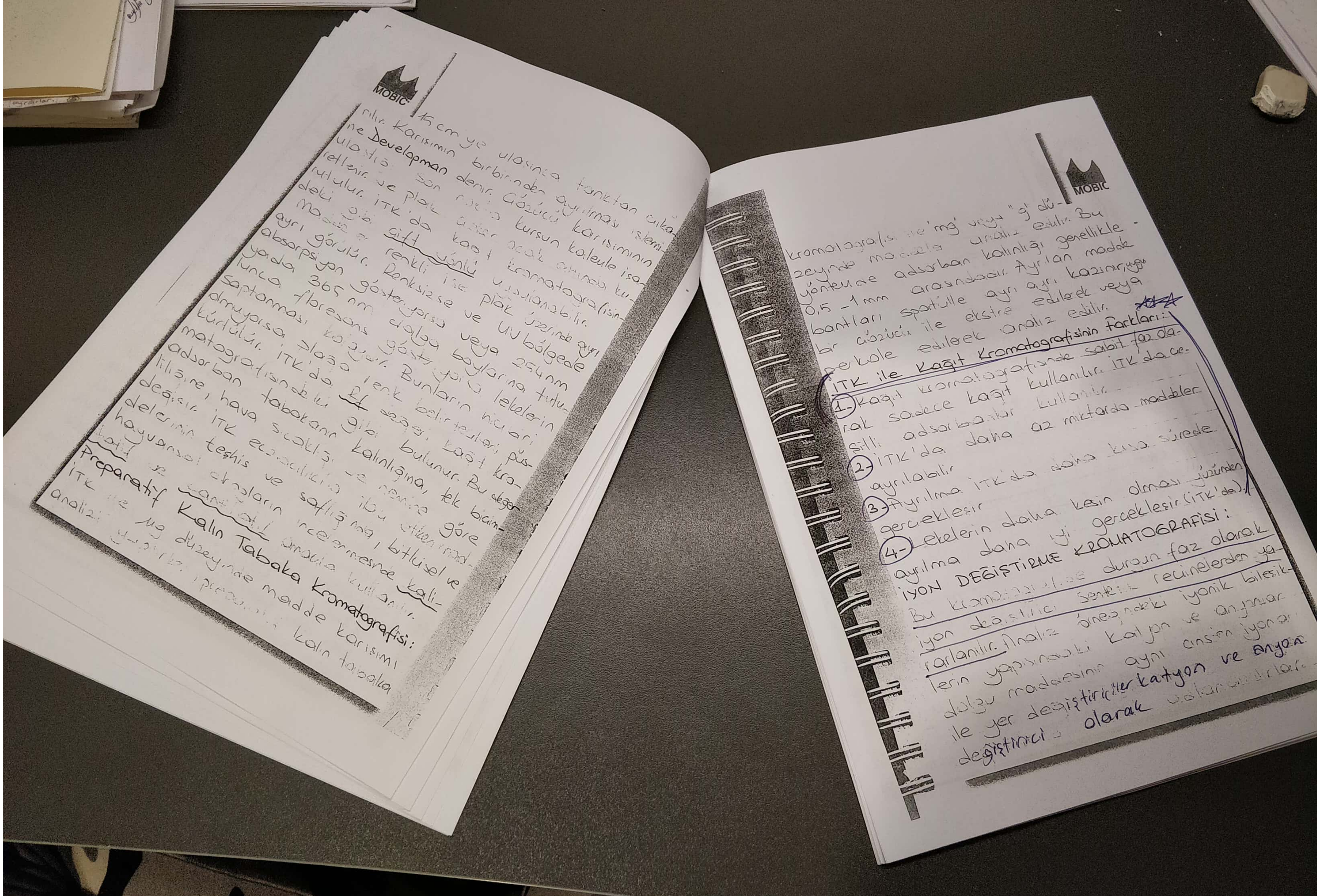
Kağıt kromatografisi genelde kalitatif bir mikroanaliz yöntemidir. Kantitatif değerlendirme için leke uygun bir çözücü ile bulunduğu yerden alınır ve UV, radyoaktivite, [illegible] ile miktarı tayin edilir. Kağıt kromatografisi çoğunlukla hidrofil maddelerin ayrılmasında kullanılır. (şekerler, polialkoller, aminoasitler, anorganik katyonlar vb.)

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK):

Düzlemsel kromatografinin bir türüdür. Çok az miktardaki madde karışımlarını daha çabuk, daha duyarlı ve daha basit bir şekilde ayırdığı için diğer ayırma yöntemleri içerisinde önemli bir yere sahiptir. İTK, genellikle 5x20; 10x20; 20x20 cm boyutlarında cam yada metal (alüminyum) plaklar yardımı ile yapılır. Durgun faz olarak en çok kullanılan adsorbanlar silikajel (SiO_2), alüminyum oksit (bazik, nötr veya asidik), kiselgur, poliamid (naylon tozu), selüloz ve magnezyum silikattır. Önce adsorban distile suda süspanse edilir ve sonra özel plak çekme aleti ile, homojen bir şekilde plakların üzerine kaplanır. Analitik amaçlar için bu tabaka kalınlığı 0.2 mm dir. Hazırlanan plaklar ya oda sıcaklığında 1 gece (8-12 saat) veya 110°C lik etüvde 30 dk tutularak

aktive edildikten sonra kullanılmalıdır. Kurutulmuş plaklar nem ve buhardan korunarak desikatörde saklanır. Uzun zaman bekletilmiş plaklar kullanılmamalıdır. Bazı maddeler için asidik, bazik veya tamponlanmış tabakalar gerekli olduğu için adsorban hazırlanırken, su yerine uygun bir tampon sistemi kullanılır.

İncelenecek karışımın uygun bir çözücüdeki çözeltisinden (%0.1-1 lik) mikropipet veya kapiler yardımıyla 1-10µL civarında numune, plağın yan kenarından en az 1cm, alt kenarından 2cm ve uygulama noktaları arasındaki mesafe en az 1cm olacak şekilde plağa uygulanır. Plak tanklara yerleştirilir. Bu tank hareketli faz buharları ile önceden doyurulmuş ve içerisinde en az 1-1,5 cm yüksekliğinde hareketli faz [illegible] olmalıdır. Tank içindeki hareketli faz, plak üzerinde yükselirken karışımın birbirinden ayrılmasını da sağlar. Hareketli faz plağın üstüne yetişmeden, yükselme yaklaşık



15 cm'ye ulaşınca tanktan çıkarılır. Karışımın birbirinden ayrılması işlemine **Developman** denir. Gözücü karışımının ulaştığı son nokta kurşun kalemle işaretlenir ve plak [illegible] açık ortamda kurutulur. İTK'da kağıt kromatografisindeki gibi çift yönlü uygulanabilir. Madde renkli ise plak üzerinde ayrı ayrı görülür. Renksizse ve UV bölgede absorpsiyon gösteriyorsa veya 254 nm yada 365 nm dalga boylarına tutulunca floresans gösteriyorsa lekelerin saptanması kolaydır. Bunların hiçbiri olmuyorsa, [illegible] renk belirteçleri püskürtülür. İTK'da Rf değeri, kağıt kromatografisindeki gibi bulunur. Bu değer adsorban tabakanın kalınlığına, tek biçimliliğine, hava sıcaklığı ve nemine göre değişir. İTK eczacılıkta ilaç etken maddelerinin teşhis ve saflığının, bitkisel ve hayvansal drogların incelenmesinde kalitatif ve kantitatif amaçla kullanılır.

Preparatif Kalın Tabaka Kromatografisi:

İTK ile mg düzeyinde madde karışımı analizi [illegible] preparatif kalın tabaka kromatografisinde 'mg' veya "g" düzeyinde maddeler analiz edilir. Bu yöntemde adsorban kalınlığı genellikle 0,5 - 1 mm arasındadır. Ayrılan madde bantları spatülle ayrı ayrı kazınır, uygun bir çözücü ile ekstre edilerek veya perkole edilerek analiz edilir.

İTK ile Kağıt Kromatografisinin Farkları:

1.- Kağıt kromatografisinde sabit faz olarak sadece kağıt kullanılır. İTK'da çeşitli adsorbanlar kullanılır.

2.- İTK'da daha az miktarda maddeler daha kısa sürede ayrılabilir

3.- Ayrılma İTK'da daha [illegible] gerçekleşir

4.- Lekelerin daha kesin olması yüzünden ayrılma daha iyi gerçekleşir (İTK'da).

İYON DEĞİŞTİRME KROMATOGRAFİSİ:

Bu kromatografide durgun faz olarak iyon değiştirici sentetik reçinelerden yararlanılır. Analiz örneğindeki iyonik bileşiklerin yapısındaki katyon ve anyonlar dolgu maddesinin aynı cinsten iyonları ile yer değiştirirler. katyon ve anyon [illegible] değiştiriciler olarak [illegible]

Bunlar yan zincirde iyonlaşabilen fonksiyonel gruplar içeren çapraz bağlı üç boyutlu polimerlerdir.

Katyon değiştiricilerde esas yapıya bağlı olan fonksiyonel gruplar sülfonat veya karboksilat gibi asidik gruplardır.

Anyon değiştiricilerde ise anilinyum veya tetrametil amonyum gibi bazik fonksiyonel gruplar yer alır.

Bunlar bilinmeyen asid-baz reaksiyonlarını verirler. Polimerik yapılı fonksiyonel gruplar çözeltide suda çözünmez. Sadece karşıt iyon çözeltiye geçer veya çözeltiden alınıp iyon değiştiricide tutulur.

resme

$Reç-SO_3H + Na^+ \rightarrow Reç-SO_3Na + H^+$

$Reç-N^+OH + Cl^- \rightarrow Reç-N^+Cl + OH^-$

Genellikle 3 yüklü iyonlar iki yüklülerden, 2 yüklü iyonlarda bir yüklü iyonlardan daha fazla tutulurlar. Aynı yüklü olanlarda ise iyon çapı büyük olanlar, küçük olanlardan daha fazla tutulurlar.

Bu yöntemin aminoasit karışımlarının ayrılmasında önemli **bir yeri** vardır. Ayrıca atıksu ve [illegible] analizinde de kullanılmaktadır.

Afinite Kromatografisi:

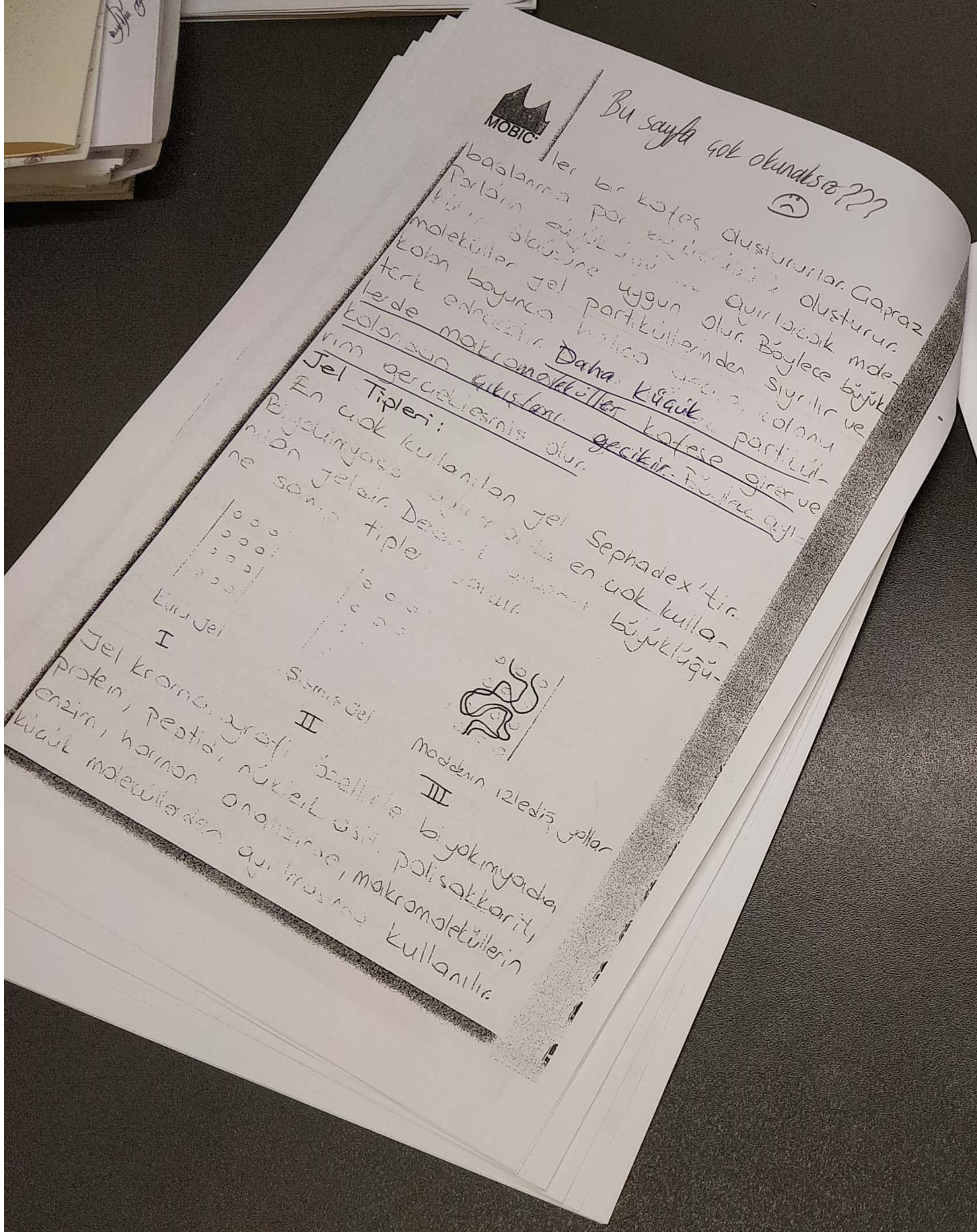
Adsorpsiyon kromatografisinin bir tipidir. En yeni tekniklerdendir. Ayrılacak maddelerin durgun faza duydukları (özel) kimyasal ve fiziksel ilgilerinin değişik oluşuna göre ayırım gerçekleşir. Durgun faz makromoleküler yapıdadır. Kolon uygun bir tampon çözeltiyle yıkanarak madde saf halde elde edilir.

Hücre kültürlerinden bazı cins hücrelerin ayrılmasında bu yöntemden yararlanılır.

Jel Kromatografisi (Moleküler Eleme Kromatografisi): → Uygun bir çözücüde şişerek jel oluşturan makromoleküler durgun fazın maddeleri molekül büyüklüğüne göre ayırmaktadır.

Durgun faz hidrofilik bir jel, hareketli faz sulu bir çözücü ise yönteme Jel Filtrasyon Kromatografisi; durgun faz hidrofobik bir jel, hareketli faz organik bir çözücü ise yönteme Jel Permeasyon Kromatografisi adı verilmektedir.

Jel partikülleri, çapraz bağlanmış, polimerik zincirlerin [illegible] üç boyutlu makromolekü-



Bu sayfa çok okunaklısa??? ☹

ler bir kafes oluştururlar. Çapraz bağlanma por büyüklüğünü oluşturur. Porların [illegible] ayrılacak molekülün büyüklüğüne uygun olur. Böylece büyük moleküller jel partiküllerinden sıyrılır ve kolon boyunca hızlıca [illegible] kolonu terk ederler. Daha küçük partiküllerde makromoleküller kafese girer ve kolonun çıkışları gecikir. Bu [illegible] ayırım gerçekleşmiş olur.

Jel Tipleri:

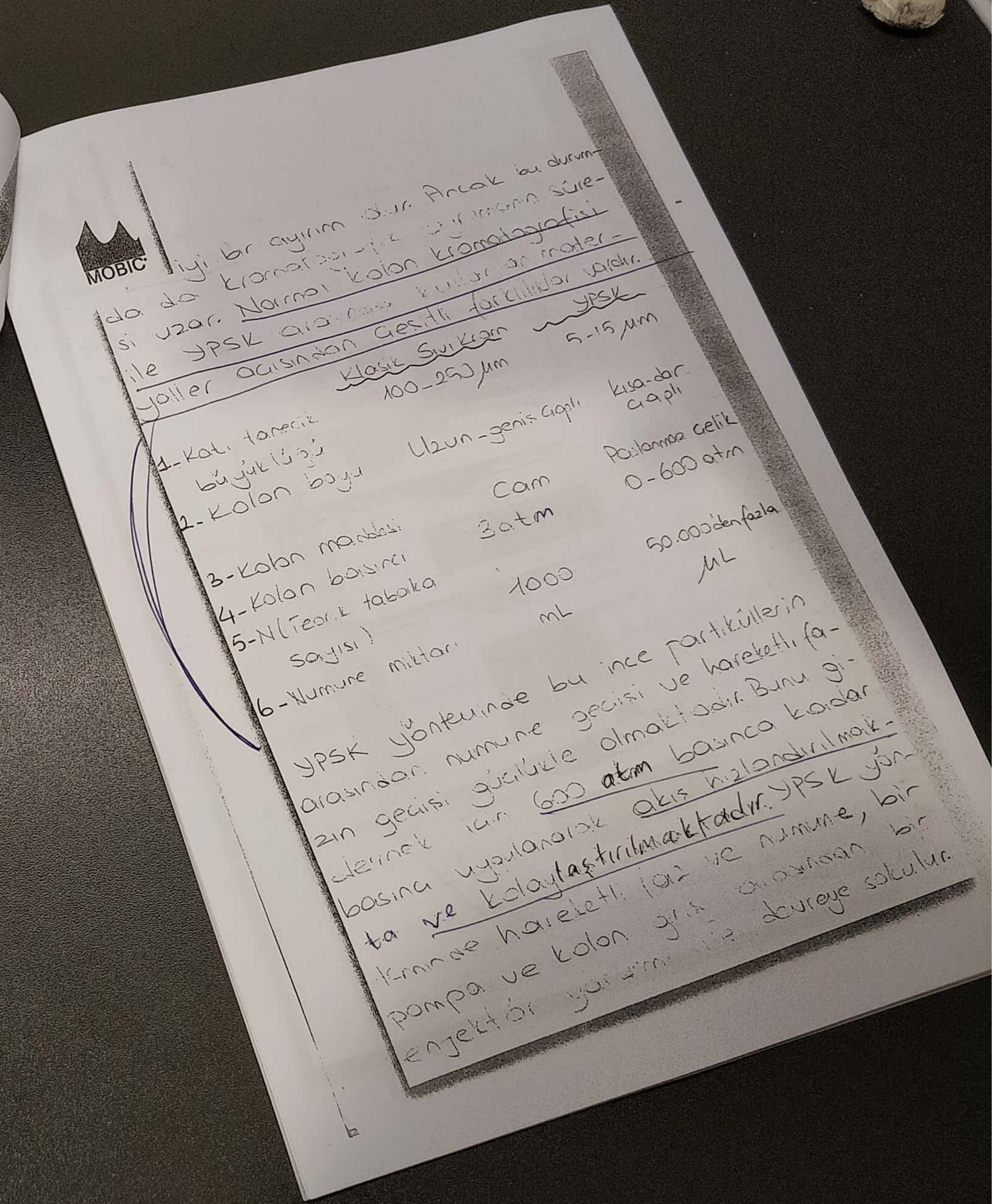
En çok kullanılan jel Sephadex'tir. Biyokimyasal [illegible] en çok kullanılan jeldir. Değişik [illegible] büyüklüğüne sahip tipleri vardır.

Kuru Jel
I

Şişmiş Jel
II

Maddenin izlediği yollar
III

Jel kromatografi özellikle biyokimyada protein, peptid, nükleik asit, polisakkarit, enzim, hormon analizinde, makromoleküllerin küçük moleküllerden ayrılmasında kullanılır.



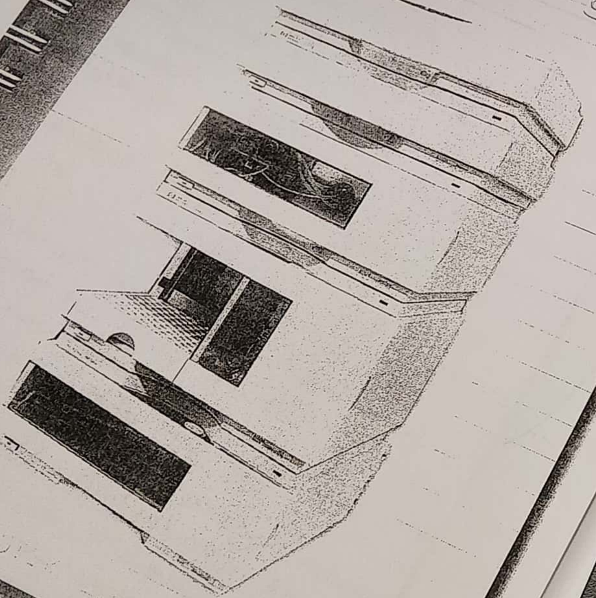
iyi bir ayırım olur. Ancak bu durumda da kromatografik ayırımın süresi uzar. Normal kolon kromatografisi ile YPSK arasında kullanılan materyaller açısından çeşitli farklılıklar vardır.

	Klasik Sıvı Krom	YPSK
1- Katı tanecik büyüklüğü	100-250 µm	5-15 µm
2- Kolon boyu	Uzun-geniş çaplı	Kısa-dar çaplı
3- Kolon maddesi	Cam	Paslanmaz çelik
4- Kolon basıncı	3 atm	0-600 atm
5- N (Teorik tabaka sayısı)	1000	50.000'den fazla
6- Numune miktarı	mL	µL

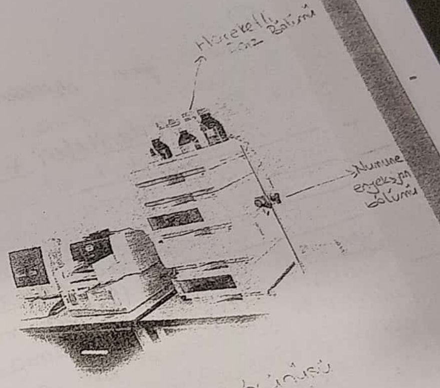
YPSK yönteminde bu ince partiküllerin arasından numune geçişi ve hareketli fazın geçişi güçlükle olmaktadır. Bunu gidermek için **600 atm** basınca kadar basınç uygulanarak akış hızlandırılmakta ve kolaylaştırılmaktadır. YPSK yönteminde hareketli faz ve numune, bir pompa ve kolon girişinde bulunan bir enjektör yardımı ile devreye sokulur.

2.

Modern YPSK sistemleri, genel olarak kullanılan tanecik boyutu 2-10 µm arasındaki dolgu maddeleri ile uygun akış hızlarının elde edilebilmesi için yüzlerce "atm" basıncın uygulanması gereken yöntemlerdir.



Modern bir YPSK [illegible] görünüşü



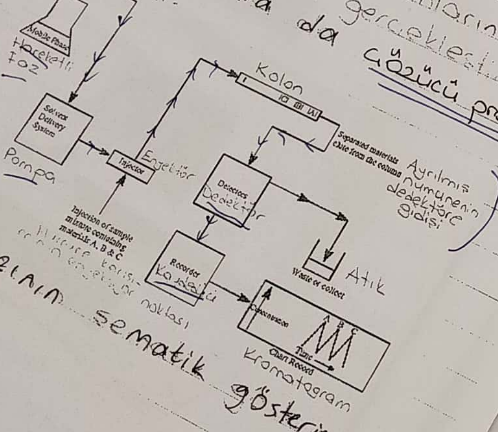
YPSK Cihazının Görünüşü

Modern bir YPSK cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200 - 1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazneler içerir. Hareketli faz bu bölümlerde yer alır. YPSK cihazının kolonda veya dedektörde bozucu [illegible] olan sönmüş gazların [illegible] bölüm de bulunmaktadır. Bu sönmüş gazlar [illegible] O_2 ve [illegible] Bu gaz [illegible] bant genişlemesine ve dedektörün [illegible] bozucu etkilere sahiptir.

Sabit [illegible] tek bir çözücü veya belirli bir çözücü karışımını tek bir [illegible]

(55)

hareketli faz şişesinden kullanarak yapılan ayırmaya izokratik elüsyon adı verilir. Polariteleri birbirinden farklı iki, üç veya dört çözücünün belirli oranlarda ayrı hareketli faz şişesinden alınıp cihazda birleştirilmesiyle kullanılarak yapılan ayırmaya gradient elüsyon adı verilir. Elüsyon başladıktan sonra belirli bir programa göre bazen sürekli, bazen de bir seri basamaklar halinde çözücülerin oranlarının değiştirilmesiyle ayırım gerçekleştirilir. Bu türdeki ayırma da çözücü programlama ~~mast~~ denir.


Mobile Phase
Hareketli Faz
Solvent Delivery System
Pompa
Injector
Enjektör
Injection of sample mixture containing materials A, B & C
Numune karışımının enjektör noktası
Kolon
Separated materials elute from the column
Ayrılmış numunenin dedektöre gidişi
Detector
Dedektör
Waste or collect
Atık
Recorder
Kaydedici
Concentration
Time
A B C
Chart Record
Kromatogram

YPSK cihazının sematik gösterimi.

Bir YPSK pompa sistemi için gereken şartlar oldukça sıkıdır ve şunları içerir:

1- 400 atm.'e kadar basınç üretimi
2- Puls içermeyen basınç akışı
3- 0,1-10 mL/dak aralığında akış hızı
4- %0,5 veya daha iyi tekrarlanabilirlikle akışının kontrolü
5- Korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflon malzeme ve sızdırmazlıkları)

Sıvılar çok fazla sıkıştırılamadıkları için YPSK pompası tarafından üretilen basınç, bir patlama tehlikesi oluşturmamaktadır. Böylece sistemin herhangi bir yerinde oluşan çatlak, sadece çözücünün sızması ile sonuçlanır. Bu tip kaçaklar yüzünden yangın tehlikesi oluşabilir.

YPSK'de Kullanılan Pompalar:

Hareketli fazın kolon içerisinden akışını sağlarlar. Çok kullanılan pompa tipleri **Sabit basınçlı ve Sabit akışlı** olarak 2 [illegible]. Sabit akışlı pompalar dişlilerine göre [illegible] kullanılırlar. Pompa basıncı genellikle 0-6000 psi'e ayarlanır. Ama modern cihazlarda basıncı [illegible] 10000 psi'e kadar çıkabilir.

Enjektörler:

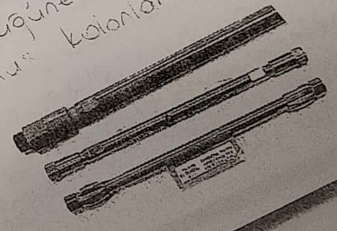
Valf ve Şırınga tipi olmak üzere iki çeşit enjeksiyon sistemi vardır. Şırınga enjektörler doğrudan kolon başına bağlanmıştır. Valf enjektörler paslanmaz çelikten yapılmış boru şeklindeki üniteye bağlıdır. Bu ünite yardımıyla kolon başına bağlanır. Valf tipi enjektörler daha dayanıklı oldukları için rutin analizlerde daha fazla kullanılır.

Sıvı Kromatografi Kolonları:

Cihazın en önemli parçasıdır. Düzgün iç çaplı, paslanmaz çelik borulardan yapılmıştır. Kullanılan kolonlar analitik ve koruyucu kolonlar olarak 2 grupta toplanır.

Analitik kolonun ömrünü arttırmak için analitik kolonun önüne konulan kısa kolona, Emniyet kolonu (koruyucu kolon) adı verilir. Bu kolonun görevi, partiküller haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak, numune içinde bulunan ve durgun faza geri dönüşümsüz bağlanan bileşikleri tutmaktır. Ayrıca bu koruyucu kolonlar hareketli fazı durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki durgun fazın aşınmasına engel olurlar. Bu nedenle emniyet kolonunun dolgu maddesi bileşimi, analitik kolonunkine benzemelidir. Emniyet kolonundaki tanecik büyüklüğü, aşınmayı en aza indirebilmek için analitik kolondaki tanecik boyutundan daha büyüktür. Emniyet kolonu kirlenince ya yeni dolgu maddesi ile doldurulur veya aynı tipte yeni bir kolonla değiştirilir.

Analitik kolonlar büyük çoğunlukta 5-30cm arasında uzunluğa ve 1-10mm iç çapına sahiptir. Kolonlarda kullanılan tanecik büyüklüğü 5-10 µm arasındadır. Günümüzde en çok kullanılan kolon 25 cm uzunlukta, 4.6 mm iç çapında ve 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi ile doldurulmuş kolonlardır.



Kolon Termostatları:

Analitik uygulamaların pek çoğunda sıcaklık kontrolü gerekli değildir ve bu durumda kolonlar oda sıcaklığında kullanılır. Ancak kolon sıcaklığının sabit tutulacağı deneylerde veya sıcaklık ihtiyacı olan deneylerde 100-150 °C'ye kadar ısıtabilen termostatlar mevcuttur.

Kolon Dolgu Maddeleri:

Sıvı kromatografide iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar:

1- Film dolgular
2- Gözenekli dolgular dır.

Sabit faz katı (adsorpsiyon) veya sıvı (dağılma) olarak kullanılır. Sabit fazın katı olduğu katı-sıvı kromatografisinde katı faz olarak genellikle silika ve alumina kullanılır. Bu tip kolonlara örnek olarak Chromosorb LC-6, Kieselgel, Porasil verilebilir.

Film dolgular, küresel, gözeneksiz, çapları 30-40 µm olan cam veya polimer tanelerin yüzeyine silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince gözenekli bir film kaplanması ile elde edilir.

Bir diğer kolon dolgu maddesi çapları 3-10 µm arasında olan gözenekli partiküllerdir. Bunlar silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçine yardımıyla elde edilir.

Sıvı-sıvı kromatografisinde kolon dolgu maddesi elde edilirken sabit faz olarak sıvıların silikajel yüzeyine kimyasal olarak bağlanmasıyla oluşan **bağlı faz dolgu maddeleri** kullanılır. Bu tür kolonlara bağlı faz adı verilir. Bu kolonlara örnek olarak

(55) C8, C18 (µ Bondapak C18), µ-Bondapak fenil vb. verilebilir.

(55) **Sıvı Kromatografisinde Kullanılan Dedektörler:**

Kolondan çıkan maddenin derişimini kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör yardımı ile ölçülür.

İdeal bir dedektörün sahip olması gereken özellikler:

1- Yeterli duyarlığa sahip olmalıdır.
2- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirliği olmalı.

3- Geniş bir doğrusal çalışma aralığı
4- Akış hızından bağımsız küçük bir cevap zamanı
5- Yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı
6- Her türden analite benzer cevap vermeli. Analitlere kolay ve seçici cevap verme özelliği olmalı.
7- Numuneyi parçalamamalı.
8- Bant genişliğini azaltabilmek için minimum iç hacimde olmalı.

Bütün bu özelliklere aynı anda sahip olan bir dedektör henüz geliştirilememiştir. Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler 2 ana başlık altında toplanabilir:

1. Yığın Özellikli dedektörler:
Hareketli fazın kırılma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi analit tarafından değiştirilen özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.

2. Analit Özellikli dedektörler:
Analitin UV absorbansı, floresans şiddeti, difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.

Absorbans Dedektörleri:

gözlenebilme sınırı 10^{-10} g/ml

Büyük bir kısmı çift ışın yolludur. Bu ışınlardan birisi elüent hücresinden diğeri de şiddetin azaltılmaması için bir filtreden geçirilir. Kromatogram, dönüştürülmüş iki sinyalin oranının logaritmasının zamana karşı çizilen grafiğinden meydana gelir. Birkaç tipi vardır.

1- Filtreli UV Absorbans Dedektörleri: En sık kullanılan dedektörlerdendir. Işık kaynağı olarak cıva lambasının kullanıldıkları bu sistemde en yaygın kullanılan dalga boyu 254 nm dir. Filtreler değiştirilerek 250 nm, 313 nm, 334 nm ve 365 nm [illegible] da kullanılabilir. Bu dalga boylarındaki ışınlar da analitin yapısına göre seçilir.

2- Monokromatörlü UV Absorbans Dedektörleri: Günümüzde en çok kullanılan ve en hızlı dedektörlerdendir. **Fotodiyot dizisi (photo diode array)** dedektörü [illegible] olmuştur. [illegible] dedektörler [illegible] çok [illegible] Bu dedektörler [illegible] aynı anda [illegible] özellikli dedektörler. Bu tip absorbans (teşhis sınırı, LOD) de gözlenebilme sınırı 10^{-10} g/ml dir.

3- IR Absorbans Dedektörleri;

2 tip IR absorbans dedektörü vardır. Birincisi 4000-690 cm⁻¹ aralığında çalışan normal IR absorbans dedektörü, diğeri de Fourier Transform IR (FT-IR) dedektörü. Analiz amaçlı pek sık kullanılan bir dedektör değildir.

Floresans Dedektörleri;

Sıvı kromatografisinde sık kullanılan seçimli dedektörlerdendir. Bu dedektörü kullanabilmek için maddenin floresans özellik göstermesi veya kendisi doğal olarak göstermiyorsa türevlendirme ile floresans yapabilmesi gereklidir. Uyarıcı ışık kaynağı civa lambası veya ksenon lambasıdır. Bu dedektörlerle ölçülebilen gözlenebilme sınırı (LOD) 10^{-11} g/mL dır.

ölçülebilen en düşük değer, kalibrasyondan bile küçük

Elektrokimyasal Dedektörler:

Kontrollü potansiyel koşullarda elektrokimyasal değişikliğe uğrayan bileşikler elektrot yüzeyinde indirgenme veya yükseltgenmeye uğradığı zaman elektrottaki elektron akımı, zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Elektrokimyasal dedektörler kulometrik ve amperometrik olarak ikiye ayrılır fakat en çok kullanılan amperometrik dedektörlerdir. Çok seçici ve duyarlı bir ölçüm yöntemidir. En sık kullanılan ölçüm elektrodu camsı karbon (glassy carbon) dur. Bu dedektörle gözlenebilme sınırı 10^{-11} g/mL dir.

Kütle Spektrometrik Dedektörler: LCMS

Sıvı kromatografisini kütle spektrometrisine bağlamadaki temel problem sıvı kromatografisinin çok fazla çözücü hacirmesi ile çalışılması, kütle spektrometrisinin ise vakum gerektirmesi ve çözücü istememesidir. Bunun için çeşitli ara bağlantılar geliştirilmiştir. Dedektör içerisinde iyonlaştırılan numunenin kromatogramı da kaydediciden alınır. Bu kromatogram [illegible] maddenin [illegible] sınırı (LOD) bilgi verir. [illegible] 1-10 pg'a kadar düşmektedir.

Kırılma İndisi (Refraktif Index) Dedektörü:

Her bileşenin miktarını ölçebilen ve seçimli olmayan dedektördür. Kırılma indisinin ölçümüne [illegible] bu dedektörlerde çok iyi bir sıcaklık kontrolü ile ölçüm yapılmalıdır. Akıs hızından etkilenmez ve güvenilirdir. Fakat seçimli dedektör grubunda yer almaz. Duyarlılıkları diğer dedektörlere göre düşüktür. Gözlenebilme sınırı (LOD) 10^{-7} g/mL dir.

Bu dedektörlerden ayrı olarak, dielektrik dedektörleri, potansiyometrik, fotoakustik ve atomik absorbsiyon ölçümlerine **dayanan** dedektörlerde vardır. Fakat kullanım alanları çok sınırlıdır.

YPSK'da Çalısma Kosulları:

1- Kullanılan çözücüler çok saf olmalı

2- Hem hareketli fazda, hem de kolonun doldurulması sırasında dolgu materyali arasında hava kabarcığı olmamalıdır.

3- Kullanılan su bidistile su olmalıdır. Bu su 48 saat içerisinde tüketilmelidir.

4- Hareketli faz olarak tampon çözelti kullanılıyorsa, taze hazırlanmalı, günlük çalısma sonunda kolon mutlaka önce su ile yıkanmalı ve en son kolondan organik bir çözücü (örn. metanol) geçirilmelidir.

GAZ KROMATOGRAFİSİ :))

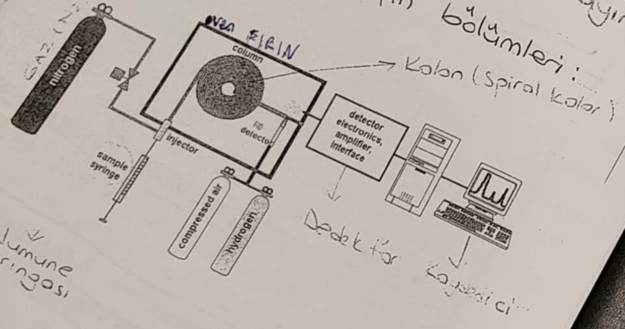
uygulama alanı [illegible]

Bir karısımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlastırılabilen maddelerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan bir kromatografi yöntemidir. Kolon içerisinde yapılan bir kromatografi olup hareketli faz olarak helyum, azot, argon gibi inert bir gaz kullanılır. Bu gaza tasıyıcı gaz adı verilir. Durgun faz ise silika, alumina, karbon (aktif kömür) gibi bir katı adsorbandır (gaz-katı kromatografisi) veya kieselguhr (kiselger) gibi inert bir katı dolgu maddesine emdirilmis yüksek sıcaklıkta kaynayan yani kolay uçucu olmayan bir polimer ya da silikon bilesiği gibi bir sıvı filmdir (gaz-sıvı kromatografisi). Ayrılmayı sağlayan özellik gaz-katı da adsorpsiyon, gaz-sıvıda ise dağılmadır.

Gaz-katı kromatografisi H_2, O_2, N_2, NO, CH_4, C_2H_4, C_3H_6 gibi gaz analizinde kullanılır. Gaz-sıvı kromatografisi ise çalısılan sıcaklıkta ölçülebilen bir buhar basıncına sahip tüm

Örganik yapıların ayrılmasında kullanılır. Gaz kromatografisi duyarlı, hızlı, ve hemen hemen bütün ilaçlara uygulanabilen son derece üstün bir ayırma yöntemidir.

Bir gaz kromatografın bölümleri :


GAZ (N2)
nitrogen
oven FIRIN
column
→ Kolon (Spiral kolon)
FID detector
injector
sample syringe
Numune şırıngası
compressed air
hydrogen
detector electronics, amplifier, interface
Dedektör
Kaydedici

(55)

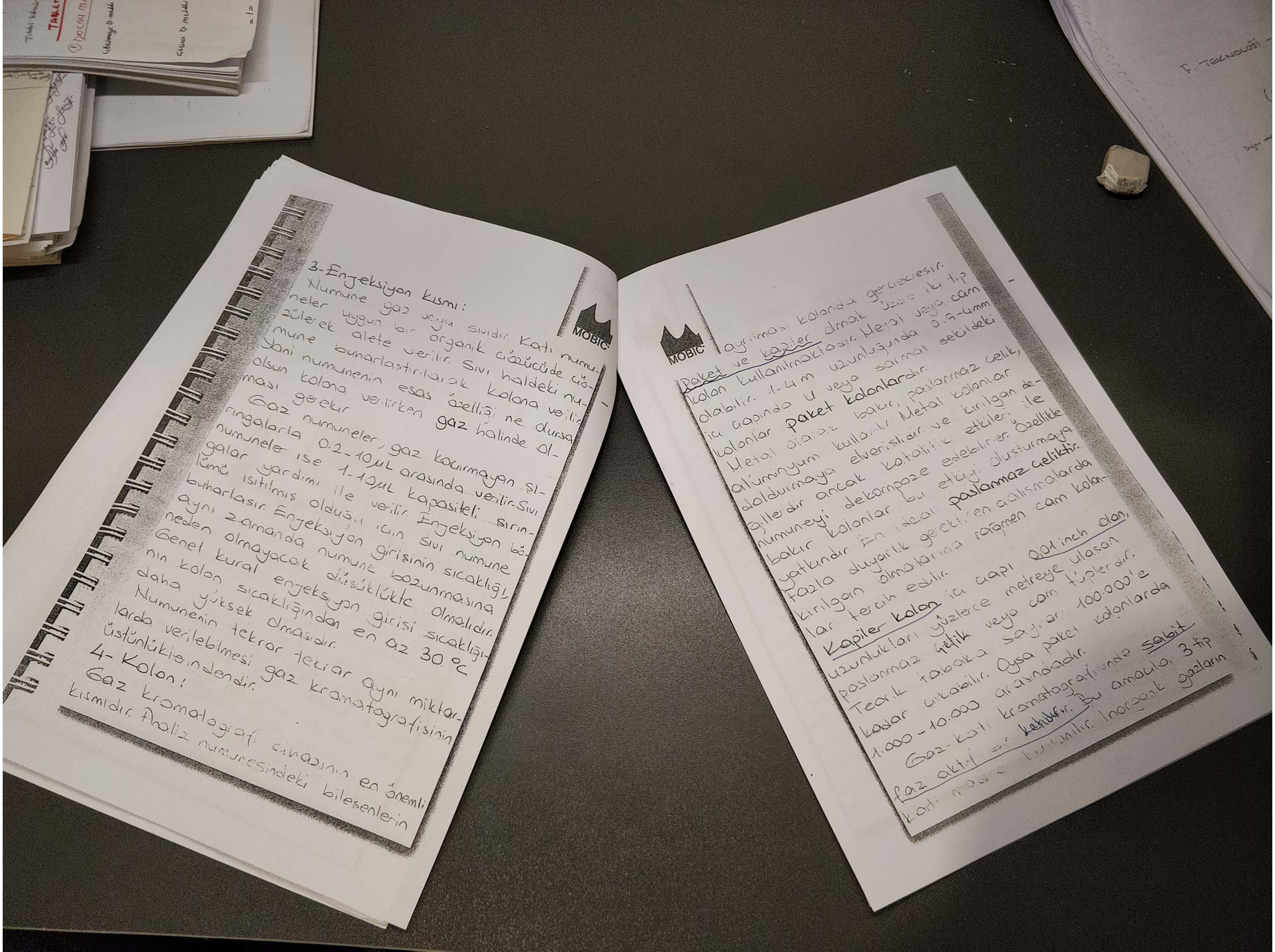
1- Taşıyıcı gazın içinde bulunduğu gaz silindirleri
2- Taşıyıcı gazın basıncı ve akısını düzenleyen kısım
3- Enjeksiyon kısmı
4- Kolon 5- Fırın
6- Dedektör
7- Kaydedici

1_Taşıyıcı gaz silindirleri :

Gaz kromatografisinde kullanılan taşıyıcı gaz yüksek basınçlı gaz silindirleri içerisinde bulunur. En fazla kullanılan taşıyıcı gaz, **azot**, **hidrogen**, **helyum** ve **argon**dur. Taşıyıcı gazda aranan özellikler analiz numunelerine karşı inert olması, dansitesinin yüksek olması, difüzyon özelliğinin çok az olması, saf olması, ucuz olması ve kullanılan dedektöre uygun olması dır

2-Taşıyıcı gazın basıncı ve akısını düzenleyen kısım:

Gaz kromatografisinin güvenilirliği açısından kullanılan taşıyıcı gazın akısının ve basıncının ayarlanması önemlidir. Çelik tüpten çıkan gaz, önce akım düzenleyicisinden, sonra da 0-4 atm basınçlık bir ayarlayıcıdan geçirilir. Gaz akışı ayarlayıcısı dakikada 200 ml'ye kadar gaz verebilir. Çalışılan her kolon için en uygun akış hızı en yüksek teorik tabaka sayısının elde edildiği hızdır.



3-Enjeksiyon kısmı:

Numune gaz veya sıvıdır. Katı numuneler uygun bir organik çözücüde çözülerek alete verilir. Sıvı haldeki numune buharlaştırılarak kolona verilir. Yani numunenin esas özelliği ne dursa olsun kolona verilirken **gaz** halinde olması gerekir.

Gaz numuneler, gaz kaçırmayan şırıngalarla 0.2-10µL arasında verilir. Sıvı numuneler ise 1-10µL kapasiteli şırıngalar yardımı ile verilir. Enjeksiyon bölümü ısıtılmış olduğu için sıvı numune buharlaşır. Enjeksiyon girişinin sıcaklığı aynı zamanda numune bozunmasına neden olmayacak düşüklükte olmalıdır. Genel kural enjeksiyon girişi sıcaklığının kolon sıcaklığından en az 30 °C daha yüksek olmasıdır.

Numunenin tekrar tekrar aynı miktarlarda verilebilmesi gaz kromatografisinin üstünlüklerindendir.

4- Kolon:

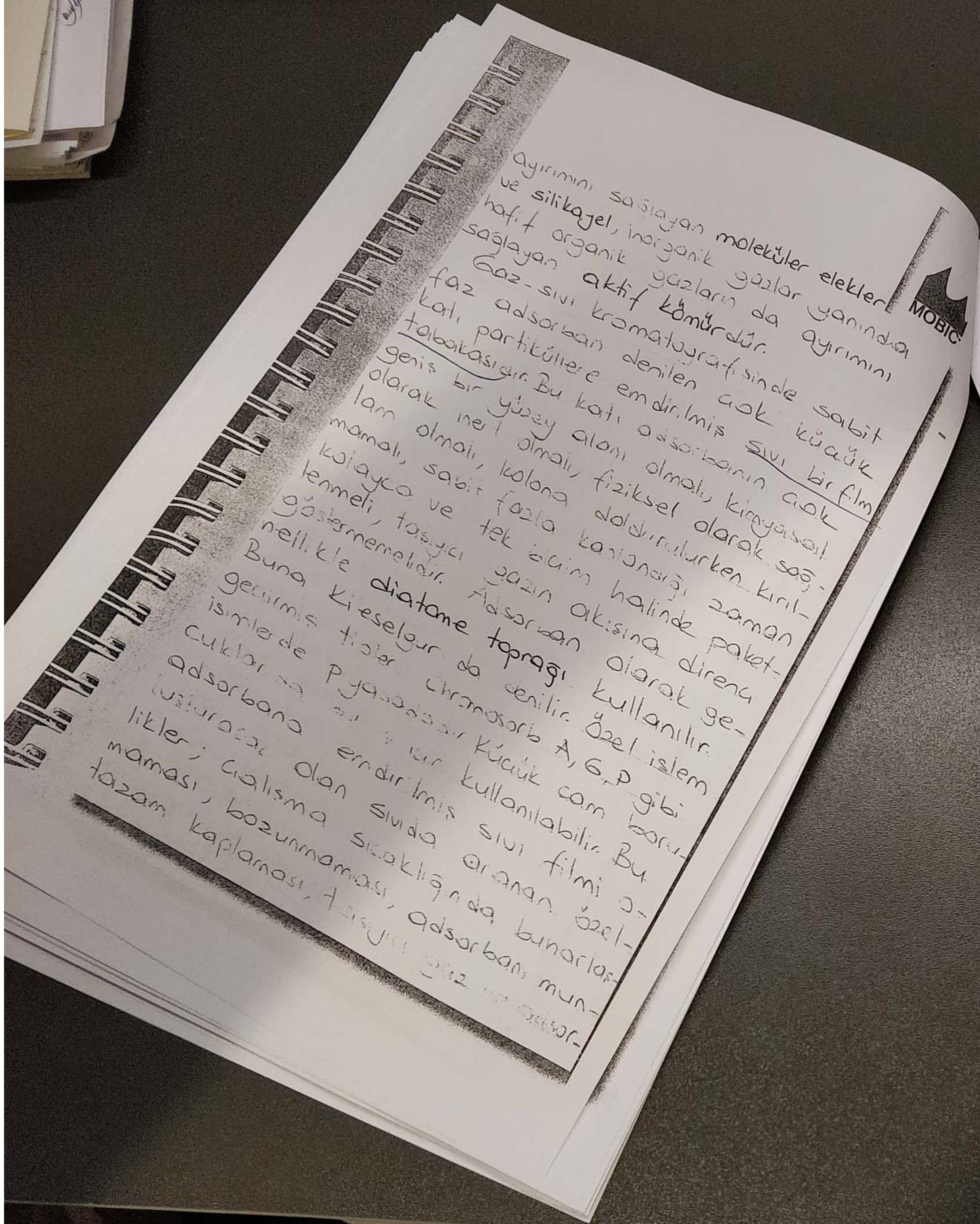
Gaz kromatografi cihazının en önemli kısmıdır. Analiz numunesindeki bileşenlerin ayrılması kolonda gerçekleşir.

Paket ve kapiler olmak üzere iki tip kolon kullanılmaktadır. Metal veya cam olabilir. 1-4 m uzunluğunda 0.5-4mm iç çapında U veya sarmal şekildeki kolonlar **paket kolonlardır**.

Metal olarak bakır, paslanmaz çelik, alüminyum kullanılır. Metal kolonlar doldurmaya elverişlidir ve kırılgan değillerdir ancak katalitik etkileri ile numuneyi dekompoze edebilirler. Özellikle bakır kolonlar bu etkiyi oluşturmaya yatkındır. En ideali **paslanmaz çeliktir**. Fazla duyarlık gerektiren çalışmalarda kırılgan olmalarına rağmen cam kolonlar tercih edilir.

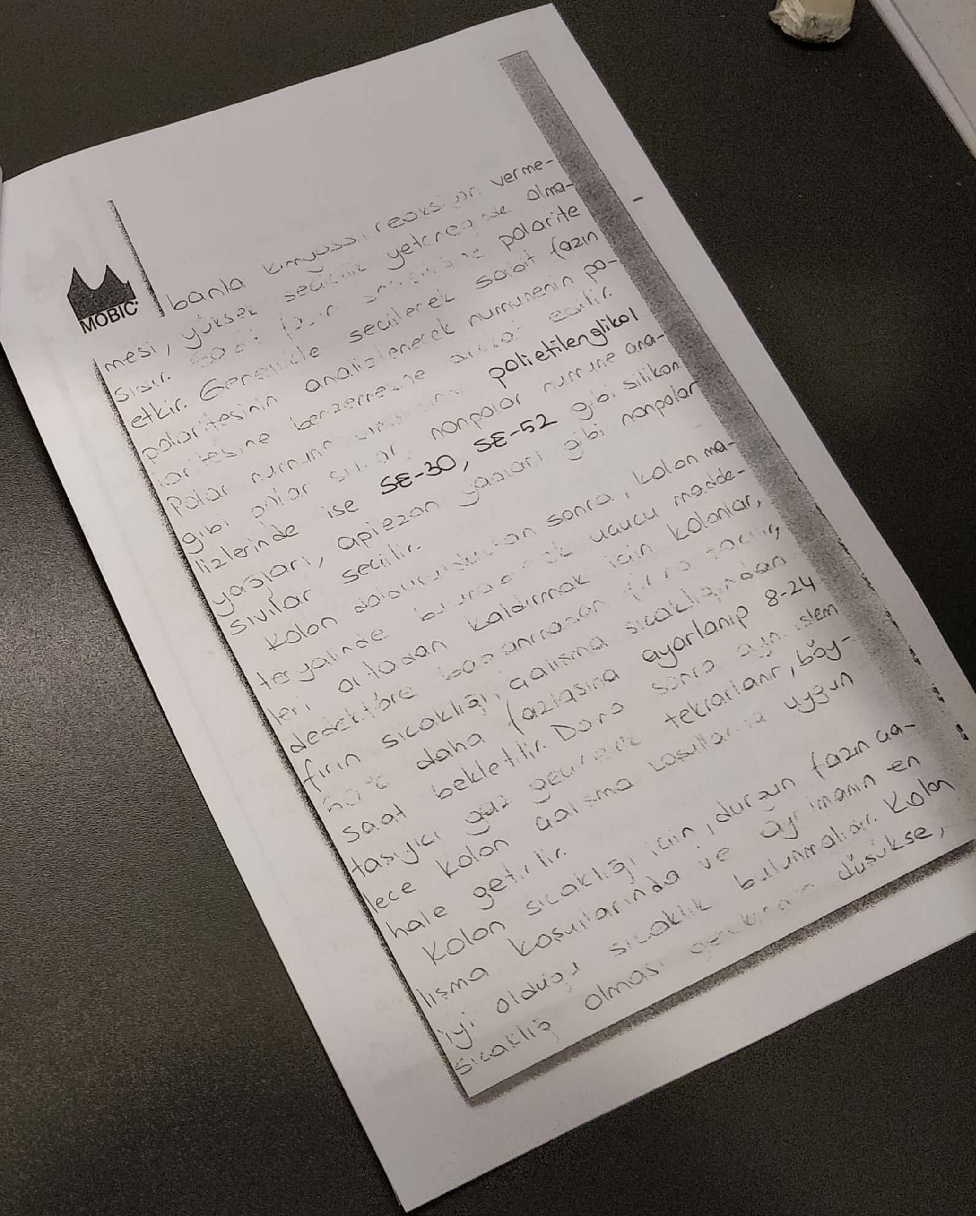
Kapiler kolon iç çapı 0.01 inch olan, uzunlukları yüzlerce metreye ulaşan paslanmaz çelik veya cam tüplerdir. Teorik tabaka sayıları 100.000'e kadar çıkabilir. Oysa paket kolonlarda 1.000-10.000 arasındadır.

Gaz-katı kromatografisinde sabit faz aktif bir katıdır. Bu amaçla 3 tip katı madde kullanılır. İnorganik gazların



ayırımını sağlayan moleküler elekler
ve silikajel, inorganik gazlar yanında
hafif organik gazların da ayırımını
sağlayan **aktif kömürdür.**

Gaz-sıvı kromatografisinde sabit
faz adsorban denilen çok küçük
katı partiküllere emdirilmiş sıvı bir film
tabakasıdır. Bu katı adsorbanın çok
geniş bir yüzey alanı olmalı, kimyasal
olarak inert olmalı, fiziksel olarak sağ-
lam olmalı, kolona doldurulurken kırıl-
mamalı, sabit fazla kaplandığı zaman
kolayca ve tek biçim halinde paket-
lenmeli, taşıyıcı gazın akışına direnç
göstermemelidir. Adsorban olarak ge-
nellikle **diatome toprağı** kullanılır.
Buna Kieselgur da denilir. Özel işlem
geçirmiş tipler Chromosorb A, G, P gibi
isimlerde piyasadadır. Küçük cam boru-
cuklar [illegible] kullanılabilir. Bu
adsorbana emdirilmiş sıvı filmi o-
luşturacak olan sıvıda aranan özel-
likler; çalışma sıcaklığında buharlaş-
maması, bozunmaması, adsorbanı mun-
tazam kaplaması, taşıyıcı gaz ve adsor-



banla kimyasal reaksiyon verme-
mesi, yüksek seçicilik yeteneğine olma-
sıdır. Sabit fazın seçiminde polarite
etkir. Genellikle seçilerek sabit fazın
polaritesinin analizlenecek numunenin po-
laritesine benzemesine dikkat edilir.
Polar numunenin analizinde **polietilenglikol**
gibi polar sıvılar, nonpolar numune ana-
lizlerinde ise **SE-30, SE-52** gibi silikon
yağları, apiezon yağları gibi nonpolar
sıvılar seçilir.

Kolon doldurulduktan sonra, kolon ma-
teryalinde bulunabilecek uçucu madde-
leri ortadan kaldırmak için kolonlar,
dedektöre bağlanmadan fırına taşıyıcı
fırın sıcaklığı, çalışma sıcaklığından
20°C daha fazlasına ayarlanıp 8-24
saat bekletilir. Daha sonra aynı işlem
taşıyıcı gaz geçirilerek tekrarlanır, böy-
lece kolon çalışma koşullarına uygun
hale getirilir.

Kolon sıcaklığı için, durağan fazın ça-
lışma koşullarında ve ayrımın en
iyi olduğu sıcaklık bulunmalıdır. Kolon
sıcaklığı olması gerekenden düşükse,